

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.

7. Jg., S. 25—27, Januar 1969

## Kinetische Bestimmung der 5'-Nucleotidase<sup>1)</sup> im Serum

Von K. LEYBOLD, J. BECKMANN und L. WEISBECKER

Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universität Kiel

(Direktor: Prof. Dr. L. Weisbecker)

(Eingegangen am 8. August 1968)

Ein schneller und empfindlicher kinetischer Test zur Bestimmung der 5'-Nucleotidase im Serum mit 5'-AMP als Substrat, in dem bei 265 nm die Umwandlung des Produktes Adenosin in Inosin durch das Hilfsenzym Adenosindesaminase photometrisch gemessen wird, wird beschrieben. Zur korrekten Aktivitätsbestimmung wird die unspezifische 5'-AMP-Hydrolyse in einfacher Weise abgegrenzt.

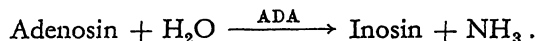
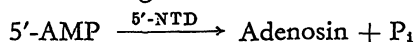
### Kinetic determination of serum 5'-nucleotidase

A rapid and sensitive kinetic method for determination of 5'-nucleotidase in serum with 5'-AMP as substrate is described. The conversion of the product adenosine into inosine by adenosine desaminase is measured photometrically at 265 nm. The results are corrected for the non-specific hydrolysis of 5'-AMP by means of a simple control.

Mit dem Ziel, eine schnelle, empfindliche und richtige 5'-Nucleotidase-Bestimmung im Serum zu entwickeln, haben wir in der vorangegangenen Arbeit (1) zahlreiche Literaturangaben experimentell überprüft und günstige Reaktionsbedingungen ermittelt. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse beschreiben wir in dieser Arbeit eine Methodik zur kinetischen Bestimmung der 5'-Nucleotidase-Aktivität im Serum.

### Prinzip

Der Test basiert auf folgenden Reaktionen:



Die zweite Reaktion, die Umwandlung von Adenosin in Inosin, ist besonders empfindlich durch den Extinktionsabfall bei 265 nm meßbar. Die ebenfalls bei pH 7,5 an der 5'-AMP-Spaltung beteiligten unspezifischen Phosphatasen des Serums werden in einfacher Weise abgegrenzt: Alkalische Phosphatase wird im kinetischen Test mit *p*-Nitrophenylphosphat nach RICK und Mitarbeitern (2, 3)<sup>2)</sup> bei pH 9,8 bestimmt. Da das Verhältnis der AP-Aktivität im Serum bei pH 7,5 zu dem bei pH 9,8 praktisch konstant ist — Versuche hierzu werden beschrieben —, läßt sich die AP-bedingte 5'-AMP-Hydrolyse bei pH 7,5 aus dem bei pH 9,8 ermittelten AP-Wert berechnen. Nur selten braucht eine extrem hohe Prostataphosphatase berücksichtigt zu werden.

### Material und Methoden

Serum wird aus Venenblut gewonnen. Bei starker Trübung muß scharf zentrifugiert (z. B. Eppendorf-Mikrozentrifuge) oder verdünnt werden. Hämolyse und Alterung des Serums spielen praktisch keine Rolle (1).

<sup>1)</sup> Enzyme: 5'-NTD = 5'-Nucleotidase = 5'-Ribonucleotid-Phosphohydrolase (EC 3.1.3.5); ADA = Adenosindesaminase = Adenosin-Aminohydrolase (EC 3.5.4.4); AP = Alkalische Phosphatase = Orthophosphatmonoester-Phosphohydrolase (EC 3.1.3.1); SP = Saure Phosphatase = Orthophosphatmonoester-Phosphohydrolase (EC 3.1.3.2).

<sup>2)</sup> Reagenziensatz „Merckotest“ Alkalische Phosphatase, kinetischer Test.

### Reagenzien und Geräte

siehe l. c. (1)

### Lösungen

- 0,17M Tris, pH 7,5 mit HCl eingestellt.
- 31 mM MnSO<sub>4</sub> in Wasser.
- 6,2 mM 5'-AMP pH 7,5. 22,64 mg 5'-AMP · H<sub>2</sub>O werden in 6,2 ml 0,02N NaOH<sup>3)</sup> gelöst und mit Wasser auf 10,0 ml aufgefüllt (Kühlschrank).
- 2,7M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf pH 6,0 mit Ammoniak eingestellt.
- Adenosindesaminase. ADA-Suspension 10 mg/ml von Boehringer wird 1:40 mit Lösung 4 verdünnt.
- 0,2M Tartrat in Wasser<sup>3)</sup>.
- Puffer-Substrat-Gemisch. 2,9 ml Tris (Lösung 1) mit 0,05 ml MnSO<sub>4</sub> (Lösung 2) und 0,05 ml 5'-AMP (Lösung 3) ergeben die Menge für einen Test (Kühlschrank). Das Gemisch soll möglichst nur einige Tage verwendet werden. Es wird verworfen, wenn Trübung oder Spontanhydrolyse auftreten. Letztere wird im 5'-NTD-Test nach Zugabe von ADA durch entsprechenden Extinktionsabfall sichtbar; er soll 0,060 nicht überschreiten.

### Ausführung

Von dem auf 37° vorerwärmten Puffer-Substrat-Gemisch (Lösung 7) werden 3 ml in die im Küvettenhalter ebenso temperierte Küvette pipettiert. 20 µl ADA (Lösung 5) und 100 µl Serum werden hinzugefügt und sorgfältig gemischt. Die Extinktion bei 265 nm und 0,9 nm Bandbreite (= 0,2 mm Spaltbreite im PMQ 2 von Zeiss) wird auf einen Ausgangswert von 0,400 bis 0,800 eingestellt. Nach Vorinkubation von etwa einer Min. wird 4 Min. lang der Extinktionsabfall pro Min. gemessen. Zur Berechnung dient der Mittelwert. Überschreitet das ΔE/Min. 0,075, so wird das Serum mit 0,9proz. NaCl-Lösung verdünnt. Außerdem wird die AP bestimmt (Vorschrift „Merckotest AP“, kinetischer Test (2, 3)).

Will man eine erhöhte saure Prostataphosphatase berücksichtigen (20 mU/ml nach ANDERSCH und SZCYPINSKI (4)<sup>4)</sup> verfälschen den 5'-NTD-Wert um 1 mU (37°/ml), so kann man 0,3 ml Puffer durch 0,3 ml 0,2M Tartrat (Lösung 6) ersetzen (s. Abb. 1). Tartrat beeinflusst die 5'-NTD und AP nicht.

### Berechnung

Die 5'-NTD-Aktivität pro ml Serum ergibt sich dadurch, daß von der im UV-Test ermittelten 5'-AMP-Hydrolyse die AP-Aktivität bei pH 7,5, die sich durch Umrechnung aus der im kinetischen

<sup>3)</sup> Vorhanden im Reagenziensatz „Merckotest“ Saure Phosphatase.

<sup>4)</sup> „Merckotest“ Saure Phosphatase.

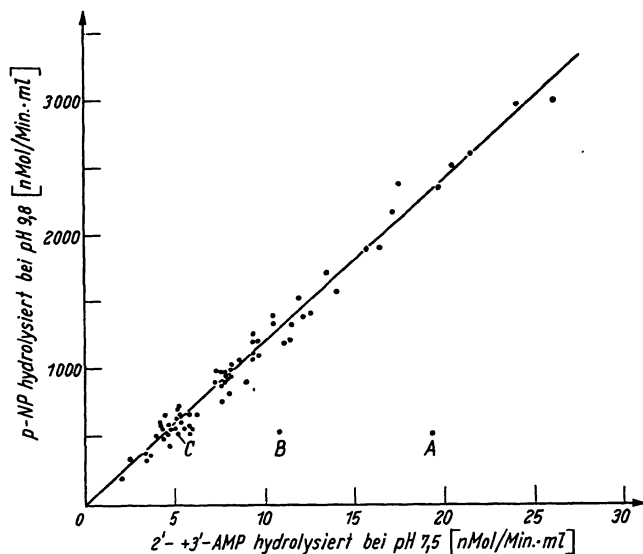


Abb. 1

Verhältnis der Hydrolyseraten von 15 mM *p*-Nitrophenylphosphat (*p*-NP) bei pH 9,8 und 100 µM 2'- + 3'-AMP bei pH 7,5 durch 68 Seren mit hoher AP- und davon 1 Serum mit hoher SP-Aktivität. A = Serum mit hoher SP-Aktivität; B = wie A, wenn im Testansatz bei pH 7,5 5'-AMP als Substrat verwendet werden würde; C = wie A, aber 0,02M Tartrat im Testansatz

## Testansätze:

pH 9,8: (nach Rick und Mitarbeitern „Merckotest“) Temp. 25°; 2,0 ml 1M Diäthanolamin; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 15 mM *p*-NP; 20 µl Serum.  
pH 7,5: Vol. 3,12 ml; Temp. 37°; 0,16M Tris-HCl; 0,5 mM MnSO<sub>4</sub>; 100 µM 2'- + 3'-AMP; 5 µg ADA in 20 µl 2,7M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,1 ml Serum

Test (2, 3) bei pH 9,8 bestimmten AP-Aktivität ergibt, subtrahiert wird:

$$\text{mU (37°)/ml 5'-NTD} = \Delta E_{265 \text{ nm}}/\text{Min.} \cdot 3570 - \text{mU/ml AP} \cdot 0,008.$$

Verdünnung muß berücksichtigt werden.

Als 1 mU bezeichnen wir entsprechend dem Vorschlag der Enzymkommission der IUB (5) die Enzymmenge, die 1 nMol 5'-AMP in einer Min. spaltet. Allerdings messen wir nicht, wie vorgeschlagen, bei 25°, sondern wegen der etwa dreifach höheren Aktivität bei 37° (vgl. l. c. (1)). Der Faktor 3570 ergibt sich aus dem Extinktionskoeffizienten der Desaminierung von Adenosin zu Inosin ( $\Delta \epsilon = 8,69 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$ ) (6) und dem Testvolumen (3,12 ml). Der Faktor 0,008 ist der aus 68 Bestimmungen berechnete mittlere Quotient aus der AP-Aktivität bei pH 7,5 und pH 9,8 (s. unten und Abb. 1). Wir messen mit 100 µM 5'-AMP 90% der theoretischen Maximalgeschwindigkeit (siehe l. c. (1)).

## Ergebnisse

## Normalwerte

Eine vorläufige Bestimmung der Serum-5'-NTD bei 40 gesunden Probanden ergab einen Normbereich von 4,0–16,5 mU (37°)/ml (Mittelwert  $\pm$  2s).

Eine Mitteilung über umfangreiche Untersuchungen an Gesunden und Patienten ist in Vorbereitung (7).

## Erläuterungen und Versuche zur Abgrenzung der unspezifischen 5'-AMP-Hydrolyse

Wir haben in 68 verschiedenen Seren mit erhöhter alkalischer Phosphatase, die von 48 Patienten mit Behinderung des Gallenabflusses und von 20 Patienten mit osteoblastischen Knochenprozessen stammten, sowohl die Hydrolysegeschwindigkeit von 100 µM 2'- + 3'-AMP (Merck Nr. 869) bei pH 7,5 im beschriebenen UV-Test (siehe l. c. (1)) als auch mit der Methode von Rick und Mitarbeitern (2, 3) die AP-Aktivität bei pH 9,8

messen. Aus Abbildung 1 geht hervor, daß die mit beiden Methoden gewonnenen Meßgrößen (mit Ausnahme der Punkte A und B) einander proportional sind. So kann aus der routinemäßig bestimmten AP-Aktivität im Serum mit einem Umrechnungsfaktor (0,008) der Anteil der AP-bedingten unspezifischen 5'-AMP-Hydrolyse ermittelt und von der im UV-Test bestimmten Gesamt-Hydrolyse des 5'-AMP abgezogen werden. Um das mögliche Ausmaß einer durch SP<sup>1</sup>) bedingten unspezifischen 5'-AMP-Hydrolyse, das mit diesem Faktor natürlich nicht erfaßt wird, zu bestimmen, haben wir auch das Serum eines Patienten mit Prostata-Carcinom mit stark erhöhter SP (209 mU/ml nach ANDERSCH und SZCYPINSKI) untersucht und dafür den in Abbildung 1 mit A bezeichneten Punkt erhalten. Da die SP im Gegensatz zu AP 2'- + 3'-AMP aber etwa 2,5mal schneller spaltet als 5'-AMP (8, 9), würde die tatsächliche SP-bedingte 5'-AMP-Hydrolyse in diesem Falle nur eine dem Abstand des Punktes B entsprechende Abweichung von der Geraden bewirken. Nach Zusatz von 0,02M Tartrat (Endkonzentration) zur Hemmung der SP (10) haben wir mit diesem Serum den Punkt C erhalten und somit die unspezifische Hydrolyse durch SP eliminiert.

Tartrat hat in dieser Konzentration keinen Einfluß auf die 5'-NTD- oder AP-Aktivität und eignet sich daher besser als z. B. 200 µM Ammoniummolybdat, das die SP zwar auch vollständig hemmt (11) aber auch die 5'-NTD-Aktivität um etwa 6% herabsetzt.

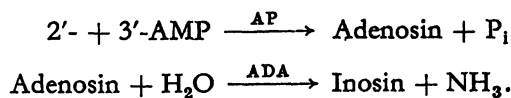
## Diskussion

Die bisher beschriebenen Methoden zur 5'-NTD-Bestimmung im Serum waren durch lange Inkubation (1/2 bis 2 1/2 Std.) und die anschließende Phosphatbestimmung sehr aufwendig und entsprechend ungenau. Der kinetische Test ist kurz (etwa 5 Min.) und läßt die Messung einer konstanten Anfangsgeschwindigkeit schnell erkennen. Der Leerwert entfällt. Die Empfindlichkeit ist entsprechend dem hohen Extinktionskoeffizienten gut. Im übrigen messen wir entsprechend den Ergebnissen der vorigen Arbeit (1) unter optimalen Testbedingungen. Die Messung bei 265 nm und die auch von allen anderen Autoren empfohlene Temperatur von 37° erfordern allerdings einen entsprechenden technischen Aufwand.

Wir messen bei einer Bandbreite von 0,9 nm, um ausreichende Lichtintensität zu erzielen. Der durch mangelhafte Monochromasie bedingte Meßfehler beträgt dabei 3%. Er erhöht sich bei 1,2 nm auf 5%, bei 1,4 nm auf 8% und bei 2,3 nm auf 20%.

Zur Bestimmung der 5'-NTD nach der beschriebenen Methode ist also die AP-Bestimmung in einem Paralleltest erforderlich. Hierfür wird heute die sehr einfache kinetische Methode bevorzugt. Die Bestimmung der AP dürfte im allgemeinen wegen der klinischen Fragestellung zusammen mit derjenigen der 5'-NTD angefordert werden. Demnach erscheint die Korrektur mit dem AP-Faktor einfacher, als wenn man — was grund-

sätzlich auch möglich ist — für jeden 5'-NTD-Test im Vergleichsansatz mit 2'- + 3'-AMP als Substrat die unspezifische Hydrolyse bei pH 7,5 analog dem kinetischen UV-Test mit 5'-AMP direkt ermittelt:



Für den praktischen Zweck der Substratkion der unspezifischen von der Gesamt-5'-AMP-Hydrolyse erweist sich die Umrechnung der bei pH 9,8 bestimmten AP-Aktivität mit einem Korrelationsfaktor auf die AP-

Aktivität bei pH 7,5 als ausreichend genau. Dünndarm-AP, die sich in dieser pH-Relation der Aktivität anders verhält (12), kommt im Serum kaum vor (13). Wie aus Abbildung 1 hervorgeht, ergibt sich durch die Streuung der Korrelation eine im Mittel um 0,55 mU (37°)/ml fehlerhafte Berechnung der 5'-NTD-Aktivität. Der Extremfall ergibt einen Fehler von 2 mU (37°)/ml.

Die mit der beschriebenen Methode ermittelten, vorläufigen Normalwerte stimmen gut mit den von CAMPBELL (14) und SALVETTI und Mitarbeitern (15) angegebenen überein.

### Literatur

1. BECKMANN, J., K. LEYBOLD und L. WEISBECKER, diese Z. 7, 18 (1969) vorstehend. — 2. RICK, W. und T. U. HAUSAMEN, Z. analyt. Chem. 212, 267 (1965). — 3. HAUSAMEN, T. U., R. HELGER, W. RICK und W. GROSS, Clinica chim. Acta Amsterdam 15, 241 (1967). — 4. ANDERSCH, M. A. und A. J. SZCYPINSKI, Amer. J. Clin. Path. 17, 571 (1947). — 5. Report of the Commission on Enzymes of the IUB, S. 6, Elsevier Publishing Company, Amsterdam (1965). — 6. SEGAL, H. L. und B. M. BRENNER, J. biol. Chemistry, 235, 471 (1960). — 7. LEYBOLD, K., W. STÜMPKE und L. WEISBECKER, In Vorbereitung. — 8. WANG, T. P., J. biol. Chemistry, 206, 299 (1954). — 9. SCHMIDT, G., in: Colowick-

Kaplan (Hrsg.): Methods in Enzymology II, S. 523. Academic Press Inc., Publishers, New York (1955). — 10. ABUL-FADL, M. A. M. und E. J. KING, Biochem. J., 45, 51 (1949). — 11. PFLEIDERER, G., in: H. M. Rauen (Hrsg.) Biochemisches Taschenbuch, S. 972. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1956). — 12. SCHWARTZ, M. K. und O. BODANSKY, Amer. J. Clin. Path. 42, 572 (1964). — 13. GROSS, W., T. U. HAUSAMEN und W. RICK, Gastroenterologia, Suppl. ad. Vol. 107, 140 (1967). — 14. CAMPBELL, D. M., Biochem. J., 82, 34p (1962). — 15. SALVETTI, A., F. AMBROGI, C. LONI und B. GRASSI, Progresso med., Napoli 21, 14 (1965).

Dr. K. Leybold  
23 Kiel  
Metzstr. 53—57